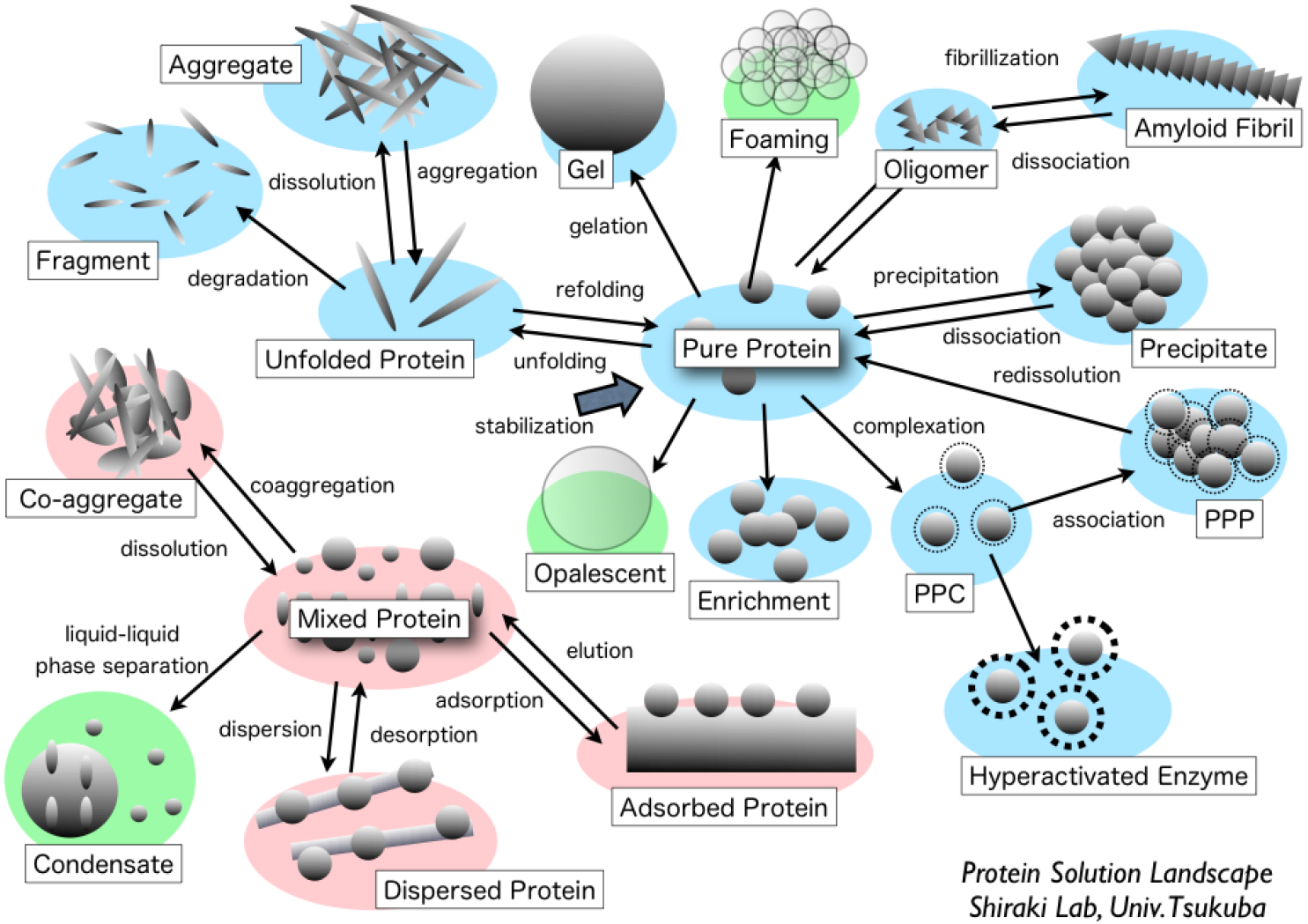
PRÁCTICA 3: PROTEINAS

PRECIPITACIÓN DE PROTEINAS

II Semestre, 2025

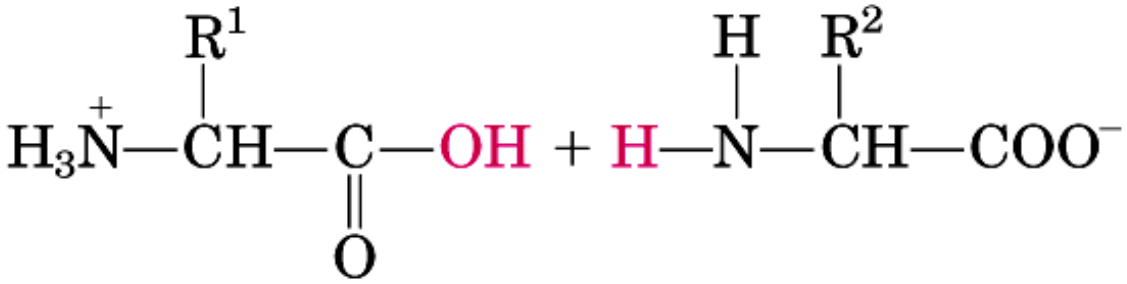
TEC | Tecnológico de Costa Rica

¿Para qué precipitar las proteínas?

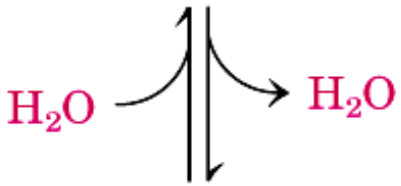


Proteínas

Polímeros de aminoácidos



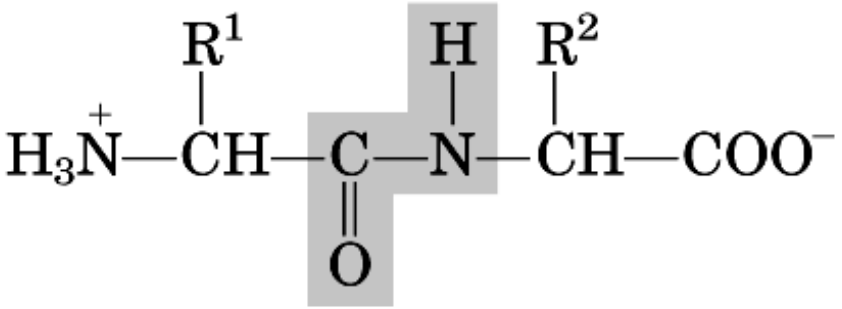
Enlace peptídico



Rxn condensación

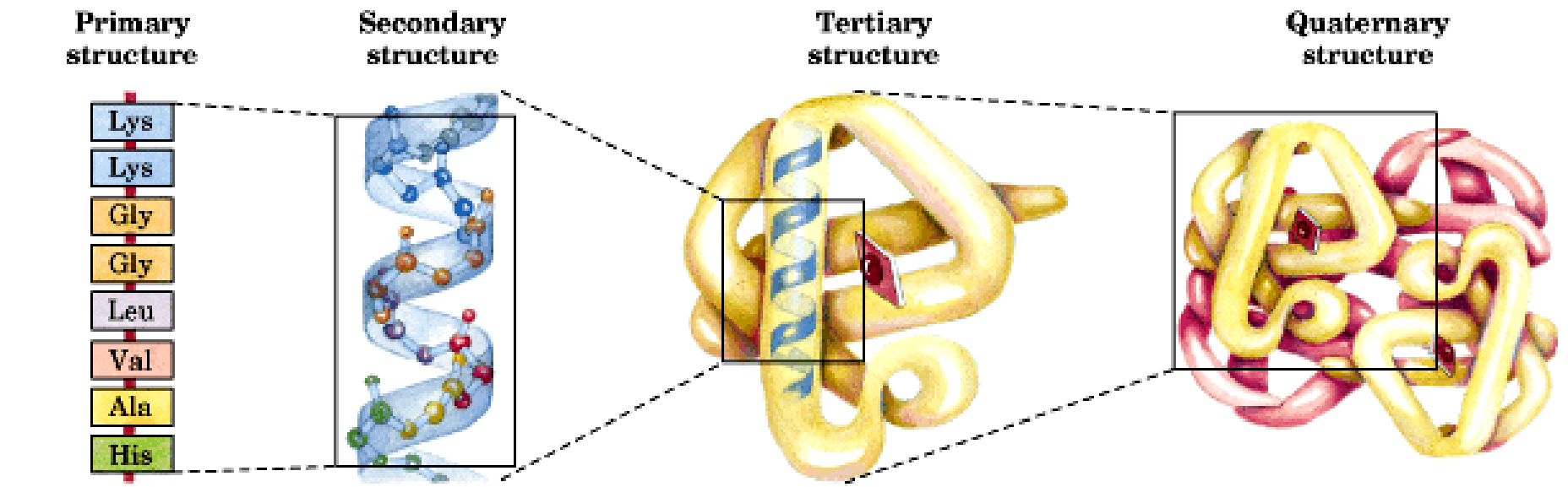
Lehninger Principios de Bioquímica
David L. Nelson y Michael M. Cox

Extremo amino



Extremo carboxilo

Proteínas



Enlaces peptídicos

α-hélices Láminas β

Conformación 3D Enlaces S-S

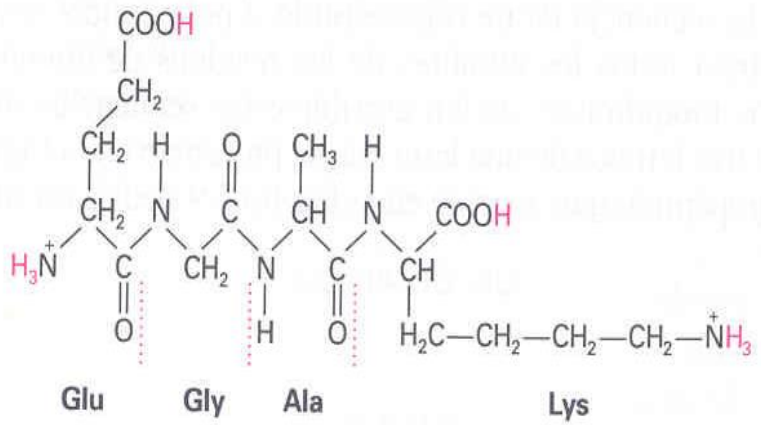
Cisteína

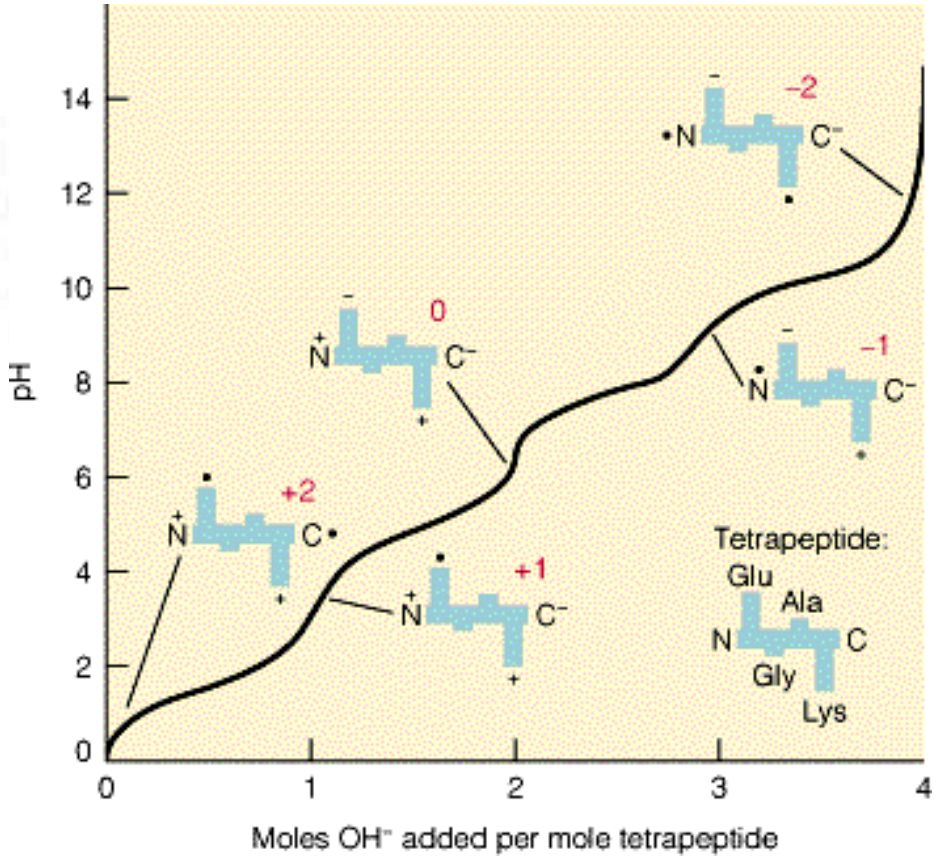
Conformación 3D Puentes H

Regiones hidrófobas en el interior e hidrofílicas en el exterior

Lehninger Principios de Bioquímica
David L. Nelson y Michael M. Cox

Curvas de titulación y pI característico





Precipitación de proteínas

La precipitación de proteínas ocurre principalmente por agregación hidrofóbica

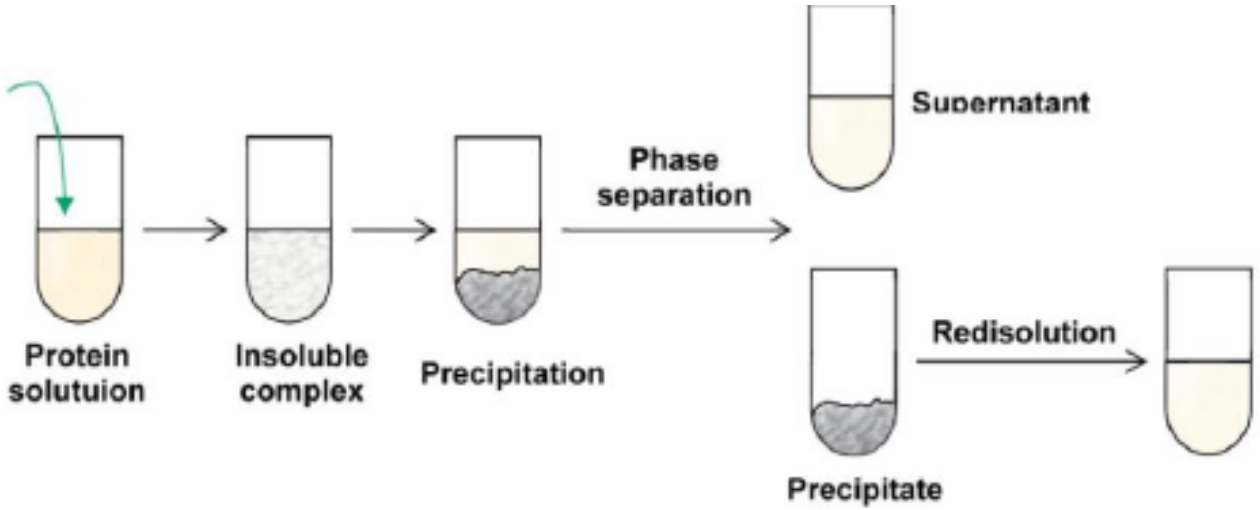
Ya sea al alterar sutilmente la estructura plegada de la proteína y exponer más del interior hidrofóbico a la solución

O al deshidratarse las capas de las moléculas de agua formadas, sobre parches hidrofóbicos en la superficie de proteínas debidamente plegadas

Precipitación de proteínas

Una vez que las proteínas comienzan a agregarse en estructuras más grandes la cantidad de agua por proteína disminuye, lo que mejora las diferencias de densidad entre las proteínas y el soluto.

Una vez que estos agregados crecen lo suficiente, y si hay bastantes interrumpen el camino de la luz a través de la solución, dándole una apariencia turbia.



The basic mechanism of precipitation (Diana Romanini, 2013)

Proteínas

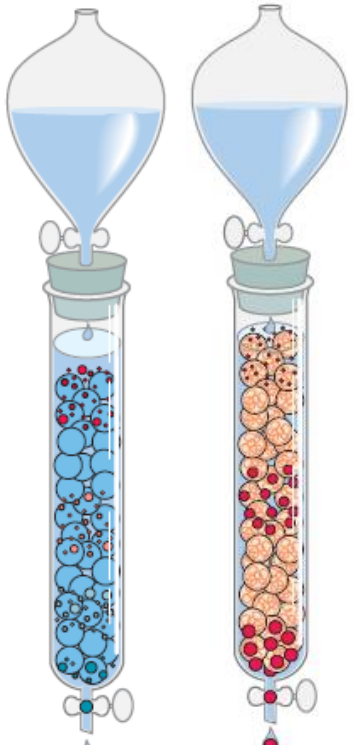
Técnicas de separación de proteínas

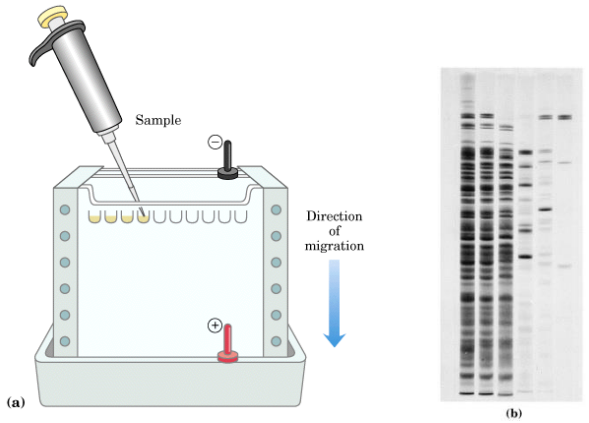
Dependen de

- Tamaño
- Carga
- Enlaces químicos
- Temperatura
- Solubilidad
- pH
- Osmolaridad

Ejemplos

- Precipitación
- Diálisis
- Cromatografía
- Electroforesis
- Enfoque isoeléctrico





Precipitación de proteínas

Fenómenos Involucrados

Desnaturalización

Solubilidad

Algunas técnicas usadas

Adición de aniones y cationes
Adición de sales
Cambio brusco de pH

Factores Determinantes

Composición iónica del medio (osmolaridad)
pH
Solventes orgánicos
Temperatura

Desnaturalización

Cambio estructural que ocasiona la pérdida de la estructura nativa y de la función de la proteína

Altera solubilidad, funcionamiento y propiedades físico-químicas de la proteína

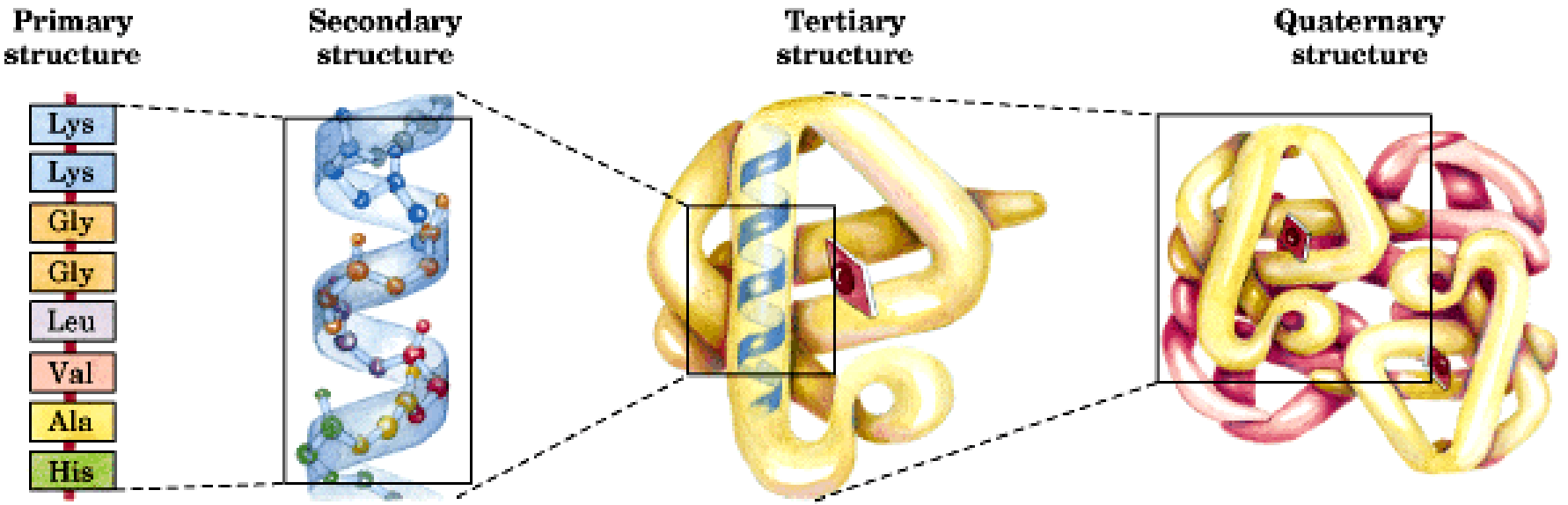
Pérdida de la estructura 3D y del plegamiento característico

Reversible y NO reversible

Agentes Desnaturalizantes

- **Físicos** → Calor
- **Químicos** → Detergentes, Disolventes orgánicos, Δ pH, Δ Fuerza iónica, Enzimas

Desnaturalización



No se altera

Se pierden α-hélices, láminas β y giros β.

Se rompen enlaces covalentes de cadenas R como S-S . Se rompen enlaces no covalentes dipolo-dipolo entre cadenas R.

Se separan subunidades o se altera su conformación (reducción)

Solubilidad

Depende de: → **pH**
Temperatura
Concentración de sales

La solubilidad de una proteína en un medio acuoso depende de su capacidad de formar puentes de H con el agua

En soluciones acuosas las proteínas forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Los iones de las sales eliminan el agua de la proteína hidratada. Cuando se rompen estas uniones, las proteínas no se mantienen en suspensión y precipitan

Efecto de sales sobre la estructura de las proteínas

Liberan a las moléculas de agua que están unidas a los puentes de hidrógeno y hace que precipiten las proteínas

Presencia de sales (electrolitos)

Sulfato de amonio

Bajas concentraciones de sales aumentan solubilidad

Altas concentraciones de sales disminuyen solubilidad

Cambios en la solubilidad

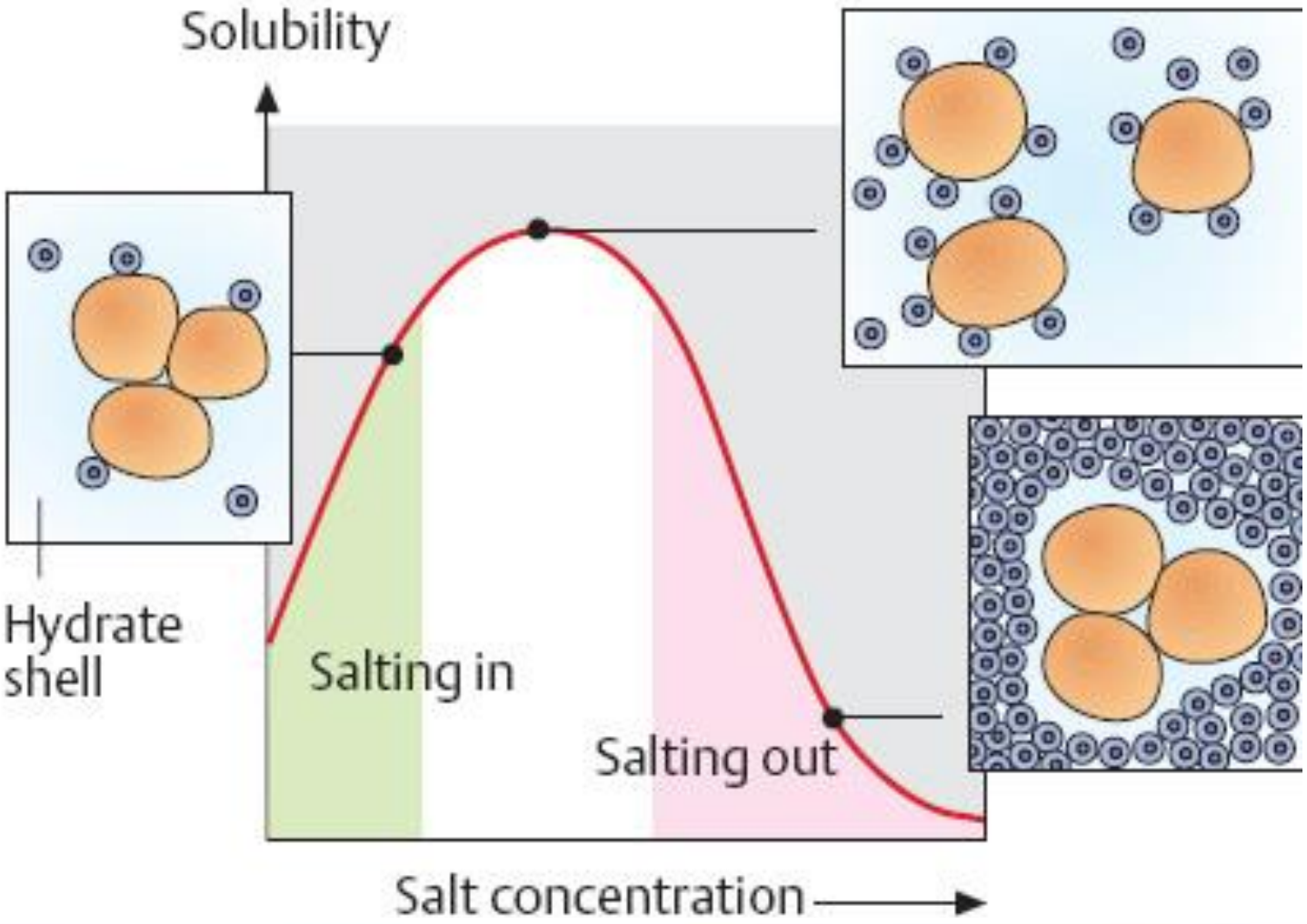
Compiten por el agua

Rompen puentes de H e interacciones electrostáticas

Deshidratación de los grupos iónicos superficiales de las proteínas

Agregación y precipitación

Efecto de sales sobre la estructura de las proteínas



Efecto de solventes orgánicos sobre la estructura de las proteínas

Cambios en la polaridad del medio

Presencia de solventes orgánicos

Etanol y Acetona

→ **Sustancias menos polares que el agua, reducen la polaridad de las soluciones acuosas**

↓

Alteración de las interacciones hidrofóbicas del interior de las proteínas

→ **Agregación y precipitación**

Compiten por el agua

La acción de los detergentes es similar a la de los solventes orgánicos

Efecto de la temperatura sobre la estructura de las proteínas

Aumento de T° aumenta la energía cinética de las moléculas

Desorganización de la interacción entre las proteínas y el agua

Rompimiento de interacciones débiles (puentes H)

Exposición de interior hidrófobo de las proteínas

Desnaturalización de la proteína

Agregación y precipitación

Efecto de iones en el medio sobre la estructura de las proteínas

Cambios en el pH del medio

Adición de cationes (+) de metales y aniones (-) de ácidos → **ELIMINAN proteínas por precipitación**

Proteína negativa + catión (+)

Proteína positiva + anión (-)

→ **Formación de sales insolubles que precipitan**

Efecto de cambios en el pH del medio sobre la estructura de las proteínas

Alteración de la carga neta de la proteína por alteración en la carga de los grupos ácidos y básicos de los aa de la proteína → **Desestabilización electrostática y rompimiento puentes H**

Carga de las proteínas depende de pH del medio y de la composición de aa → **Agregación y precipitación**

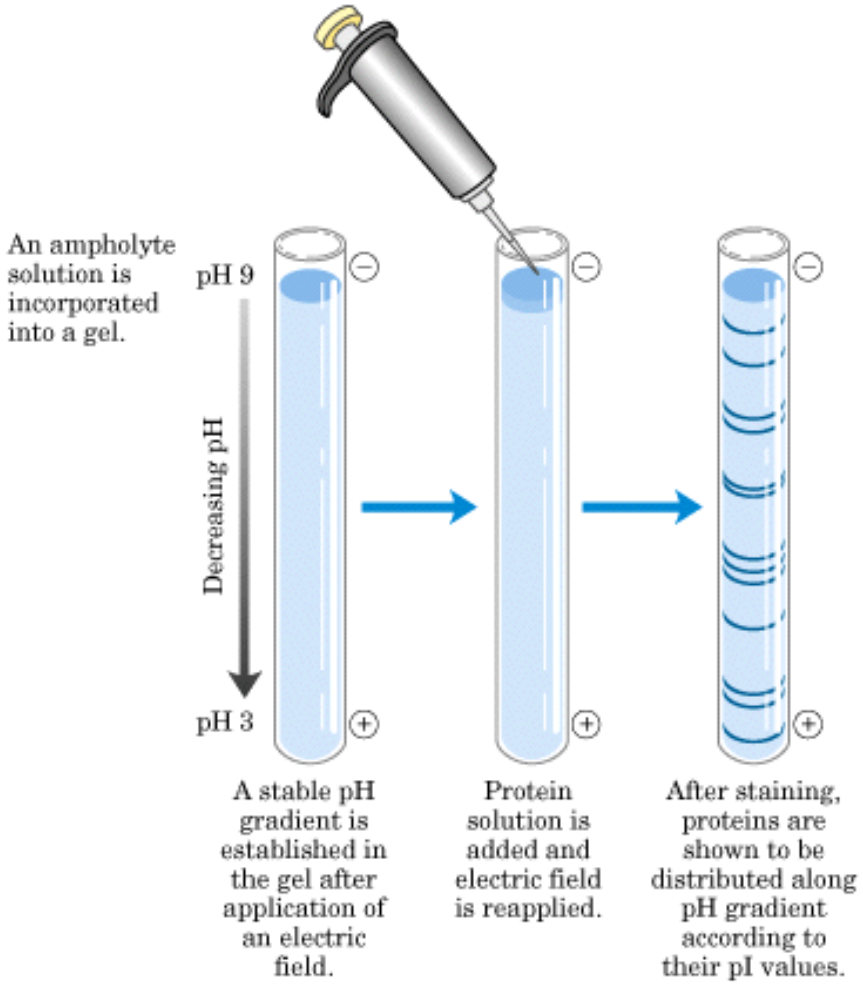
pH del medio > pI de la proteína → **Grupos ionizables se desprotonan** → **Carga negativa** → **Rxna con cationes**

pI **Solubilidad mínima o nula** → **Carga neutra**

pH del medio < pI de la proteína → **Carga positiva** → **Rxna con aniones de ácidos** **Grupos ionizables se protonan**

Efecto de cambios en el pH del medio sobre la estructura de las proteínas

El comportamiento de las cargas de las proteínas a diferente pH se utiliza para su separación mediante la precipitación isoeléctrica


An ampholyte solution is incorporated into a gel.
pH 9
Decreasing pH
pH 3
A stable pH gradient is established in the gel after application of an electric field.
Protein solution is added and electric field is reapplied.
After staining, proteins are shown to be distributed along pH gradient according to their pI values.

Cloruro Férrico	→	Catión
Acetato de Plomo	→	Catión
Ácido Pícrico	→	Anión
NaOH	→	Base

Sales	→	Liberan el agua unida a las proteínas mediante puentes de H, provocando la precipitación

Huevos →

- Muchas albúminas en solución acuosa
- Color blanco típico de la desnaturalización de la albúmina en la clara
- Albúmina precipita sólo con solución saturada de sulfato de amonio
- Globulinas precipitan en solución 50% de sulfato de amonio
- pI ovoalbúmina 4,7

Leche →

- Caseína y Lactoalbúmina
- Caseína se desnaturaliza y precipita con cambios de pH
  - pI = 4,6
- Lactoalbúmina se desnaturaliza a 60°C por cambios de T°
  - pI = 4,2 – 4,5

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS POR ADICIÓN DE ANIONES Y CATIONES

MATERIALES

Tubos de ensayo
Gradilla para tubos de ensayo
Goteros
Pipetas 5ml

REACTIVOS

Solución de clara de huevo al 20% en solución salina.
Hidróxido de sodio 10%
Ácido acético 2%
Cloruro férrico al 2%
Sulfato cúprico al 2%

PROCEDIMIENTO

1. Rotule 6 tubos de ensayo de vidrio como (1) cloruro férrico + NaOH, (2) cloruro férrico + HAc, (3) sulfato cúprico + NaOH, (4) sulfato cúprico + HAc, (5) acetato de plomo + NaOH y (6) acetato de plomo + HAc.

2. Añadir 2,5 ml de solución de clara de huevo a cada tubo. Use la misma pipeta.

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS POR ADICIÓN DE ANIONES Y CATIONES

3. A los tubos (1) y (3), agregue 1 gota de NaOH al 10%. Agite suavemente.

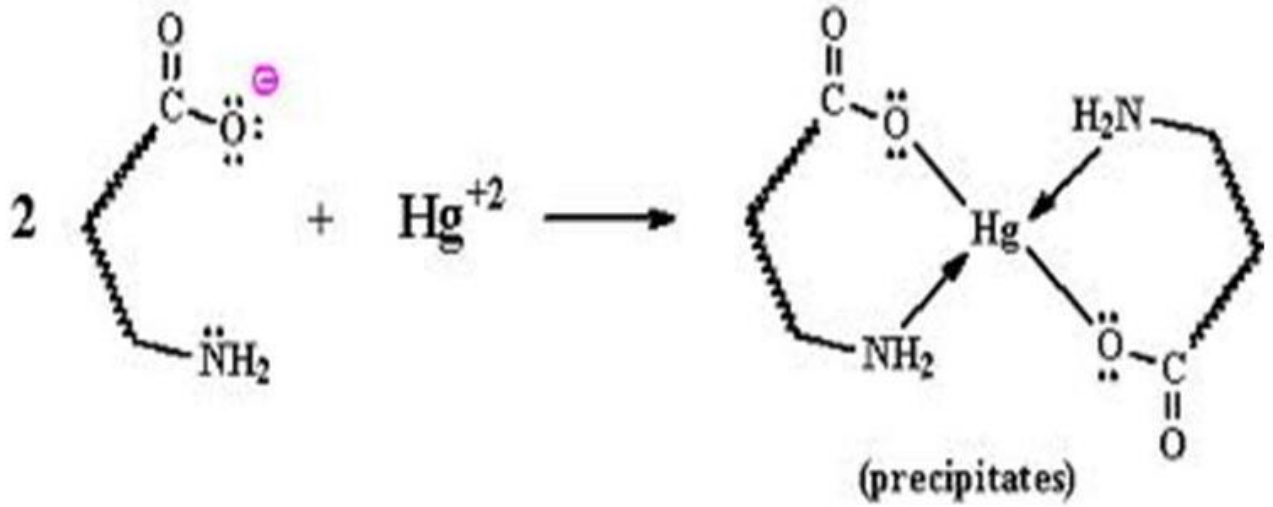
4. A los tubos (2) y (4), agregue 5 gotas de ácido acético (HAc) al 2%. Agite suavemente.

5. A los tubos (1) y (2), agregue 10 gotas de cloruro férrico al 2%. Agite y observe.

6. A los tubos (3) y (4), agregue 10 gotas de sulfato cúprico al 2%. Agite y observe.

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS POR ADICIÓN DE ANIONES Y CATIONES

Cuando cationes metálicos pesados (Hg^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2}) son agregados a una solución proteica, la carga positiva de esos cationes interactúa con la carga negativa de los grupos carboxilos, produciendo un insoluble ion metálico proteinato.



SEPARACIÓN DE ALBÚMINAS Y GLOBULINAS DE HUEVO POR PRECIPITACIÓN POR ADICIÓN DE SALES

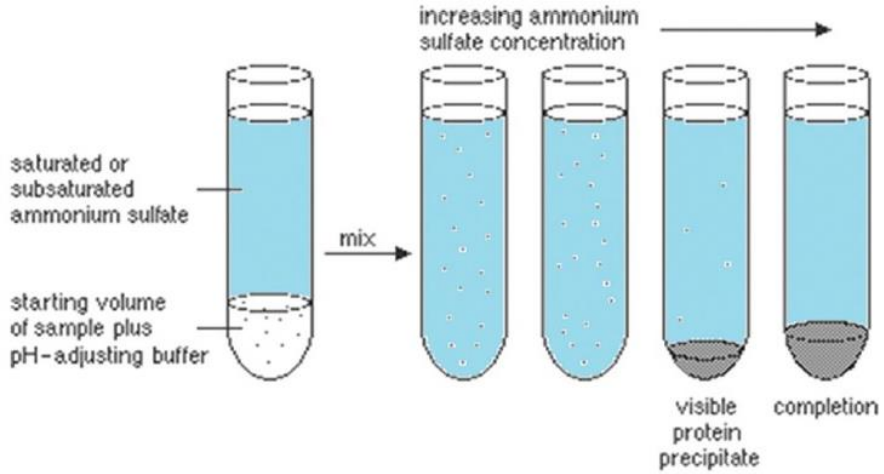
MATERIALES	REACTIVOS
Tubos de ensayo	Solución de clara de huevo al 50% en solución salina.
Gradilla	Solución saturada de sulfato de amonio
Goteros	Sulfato de amonio en cristales.
Pipetas 1ml	Solución salina (concentración fisiológica)

PROCEDIMIENTO

1.Colocar en un tubo 2,5 ml de solución de clara de huevo y 2,5 ml de la solución saturada de sulfato de amonio. Agitar.
2.Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos.
3.Separar el sobrenadante.
4.Disolver el precipitado en 3 ml de solución salina (aislamiento de globulinas, rotule y guarde para el siguiente laboratorio).
5.Añadirle al sobrenadante los cristales de sulfato de amonio hasta que se sature.
6.Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos.
7.Eliminar el sobrenadante.
8.Disolver el precipitado en 3 ml de solución salina (aislamiento de albúmina, rotule y guarde para el siguiente laboratorio).

SEPARACIÓN DE ALBÚMINAS Y GLOBULINAS DE HUEVO POR PRECIPITACIÓN POR ADICIÓN DE SALES

$(NH_4)_2SO_4$



SEPARACIÓN DE CASEÍNA Y LACTALBUMINA POR PRECIPITACIÓN POR ÁCIDOS

MATERIALES	REACTIVOS
Papel para medir pH o pHmetro	Ácido acético 6 N
2 Beakers de 250 ml	Etanol
1 Probeta de 100 ml/ 50ml	NaOH al 10 %
2 Erlenmeyers de 500 ml	Éter etílico
1 Plato de Petri	Agua destilada
1 Embudo de filtración	
Pipetas de 5 ml	
Soporte y anillo	
Calentador eléctrico	
Papel filtro	

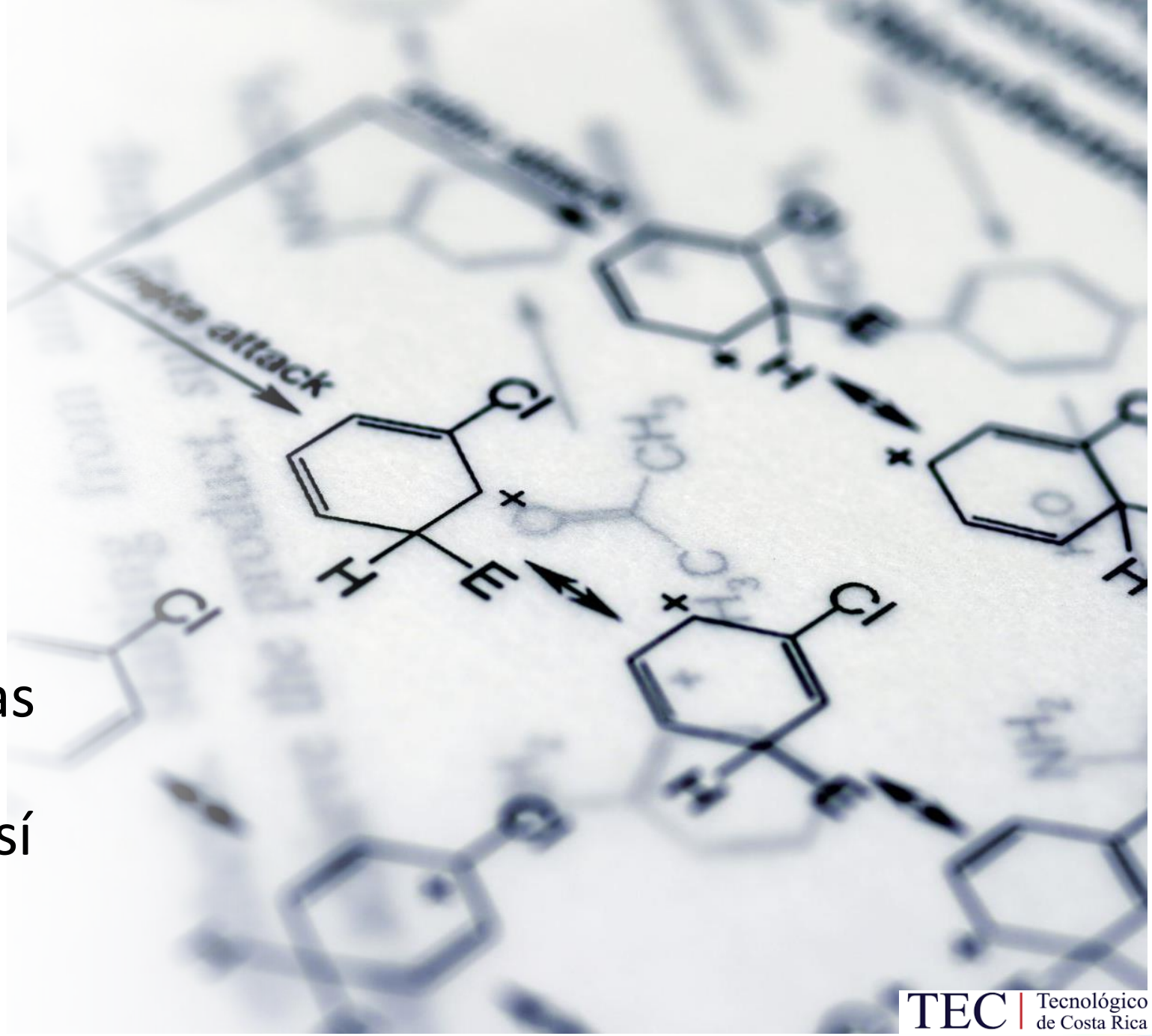
SEPARACIÓN DE CASEÍNA Y LACTALBUMINA POR PRECIPITACIÓN POR ÁCIDOS

PROCEDIMIENTO

1.Medir 80 ml de leche en una probeta y transvasarlos en un beaker de 250 ml.
2.Diluir la leche con 80 ml de agua y añadir ácido acético 6 N hasta obtener un pH aproximado de 4.6.
3.Filtrar el precipitado de caseína y **guardar el suero obtenido (A)**.
4.Lavar 2 veces el precipitado con agua usando 60 ml de agua en cada vez.
5.Lavar el precipitado de caseína con 10 ml de etanol y dos veces más con 10 ml de éter etílico (es muy inflamable).
6.Poner la caseína en un vidrio de reloj y secarlo a temperatura ambiente. (Se obtiene aproximadamente 1 g de caseína).
7.Neutralice el suero filtrado de la caseína en A, con NaOH al 10%.
8.Agregue posteriormente 3 ml de HAc 6N por c/100 ml de leche usada y caliente sobre hasta que la albúmina se precipite completamente.
9.Recoja el precipitado en un papel de filtro cuantitativo tarado y pese la cantidad de lactalbúmina obtenida.
10.Calcule el porcentaje de recuperación de ambas proteínas.

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS POR ÁCIDOS

Los ácidos o bases se emplean para alterar las cargas de las proteínas y las interacciones de los puentes de hidrógeno, y así inducir la precipitación de estas macromoléculas.



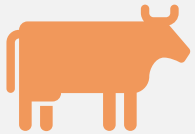
Densidad de la leche: 1,03g/ml

Caseína: 26 g/kg leche

Lactoalbúmina: 1.6 g/kg leche

Cálculo el porcentaje de recuperación de albúmina y caseína

Densidad de la leche: 1,03g/ml



Caseína 26 g/kg leche

Revisar este video
https://www.youtube.com/watch?v=HN4jD2MCKfg